WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40832

A61K 31/425

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

6. November 1997 (06.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/00820

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. April 1997 (24.04.97)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 16 486.9

25. April 1996 (25.04.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). ROSCHE, Fred [DE/DE]; Benndorfer Strasse 18a, D-06184 Dieskau (DE). SCHMIDT, Jörn [DE/DE]; Eichendorffstrasse 2, D-06114 Halle (DE). PAULY, Robert, P. [CA/CA]; 2631 Fairview Crescent, Vancouver, British Columbia V6T 2B8 (CA). MCINTOSH, Christopher, H., S. [CA/CA]; 605-2233 Allison Road, Vancouver, British Columbia V6T 1T7 (CA). PEDERSON, Ray, A. [CA/CA]; 3876 West 23rd Avenue, Vancouver, British Columbia V6S 1K9 (CA).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

(54) Title: USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSESPIEGELS IN SÄUGERN

(57) Abstract

The invention relates to the use of a method in which by reducing in the blood of a mammal by administration of effectors the enzyme activity of dipeptidyl peptidase (DP IV) or enzyme activity similar to DP IV, the endogenous (or additionally exogenously administered) insulinotropic peptide gastric inhibitory polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) and glucagon-like peptide amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆) (or similarly GLP-17.37 or analogues thereof) are decomposed in a causal sequence to a reduced extent by DP IV enzymes or those similar to DP IV. Consequently, the fall in the concentration of said peptide hormones or the analogues thereof is reduced or retarded. The increased stability, achieved by the action of DP IV effectors, of the incretine or the analogues thereof which are available endogenously or exogenously and consequently provided in increased numbers for insulinotropic stimulation of the incretine receptors of the Langerhans cells in the pancreas, changes the power of endogenous insulin thereby stimulating the metabolism of carbohydrates in the treated organism. The blood sugar level therefore drops below the glucose concentration, characteristic of hyperglycaemia, in the serum of the treated organism. Metabolic anomalies such as glucosuria, hyperlipidemia, possible serious metabolic acidosis, diabetes mellitus, which result from higher concentrations of glucose in the blood over a longer period of time, are prevented or alleviated. The method according to the invention is a novel way of lowering high blood glucose concentrations. It is simple, commercially applicable and suitable for use in human medicine for treating, in particular diseases caused by above-average blood glucose levels.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP1-42) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-17-36) (o.a. GLP-17-37 oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	ŢJ	Tadachikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige Jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	1E	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	•	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
	Kongo Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	4	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	Kr	Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	7/17		PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Ruminien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia				
DE	Deutschland	u	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSE-SPIEGELS IN SÄUGERN

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration mit Hilfe von aktivitätsmindernden *Effektoren* (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. and BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRÄUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701 (1987)]. Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖN, E., *Histochem.* 82, 41 (1987)].

01

15

20

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolinspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 (1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophylin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und

Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., FEBS-Letters 260, 131 (1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C.E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., J. of Immunology 144, 2908 (1990)].

Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen können wie strukturanaloge Prolin-haltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alaninhaltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

10

15

20

25

30

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆), Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch *Incretine*), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in situ* abspalten kann [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829 (1993)].

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher

Substrate *in vivo* kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken [DE-MUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Z. B. basiert *Diabetes mellitus* Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind [BROWN, J.C., DAHL, M., KWAWK, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C. and PEDERSON, R.A. *Peptides* 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B. KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the inulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. *Diabetologia* 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B.B., KNUDSEN, L.B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 296, 6275 (1994)].

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, als auch die moderneren Verfahren zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche *i.v.*. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

15

20

25

30

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung

des Immunsystems [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. Sci. Americ. 273 (1) 40-46 (1995)].

Die möglichst orale Applikation hochaffiner, niedermolekularer Enzyminhibitoren dagegen ist eine kostengünstigere Alternative z. B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Derartige Enzyminhibitoren finden inzwischen therapeutischen Einsatz als Immunsuppressiva, Antithrombotika und als AIDS-Virostatika. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearence-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., Design of Enzyme Inhibitors as Drugs. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACK, W.J., HATCH, S.D., MUESING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S., CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. Bioorg. Medicinal Chem. Letters 5 (23) 2897 (1995)].

Das Ziel der Erfindung ist ein einfaches und neuartiges Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels, das erfindungsgemäß dadurch erreicht werden kann, daß mittels Verabreichung von Effektoren an einen Säugerorganismus, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆ (o.a. GLP-1₇₋₃₇ oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Pepdidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

- 25 1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) zur Folge hat, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-anloger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann.
 - 2. erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat.

25

30

- die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in nachfolgender Veränderung der Glukoseinduzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.
- Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase VI (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität. Zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säugern der Verhinderung oder Milderung pathologischer
- Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidaemie, metabolischer Azidosen und Diabetes Mellitus. In einer weiteren bevorzugten Ausfuehrungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge eines Effektos der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.
 - In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Effektoren der DP IV-bzw. der DP IV-Analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.
 - Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika Alanyl-Pyrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. J. Enzyme Inhibition 3, 249 (1990)] oder in Analogie zu den in der Literatur be-

6

schriebenen Methoden herstellbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden in Form von pharmazeutischen Präparaten enthaltend den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien verabreicht. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z. B. kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolididen ein solcher Dosisbereich zwischen 1.0 mg und 10.0 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen.

10

5

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Incretine GIP₁₋₄₂ und GLP-17-36 in situ

5

Sowohl *in vitro* mit gereinigtem Enyzm als auch *in situ*, z.B. in gepooltem humanem Serum, kann man die Hydrolyse der Incretine, verursacht durch DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität, nachweisen bzw. mit Hilfe von Inhibitoren unterdrücken (Abb. 1).

Erfindungsgemäß erreicht man *in situ* bei Inkubation von 30 μM GIP₁₋₄₂ bzw. 30 μM GLP-1₇₋₃₆ und 20 μM Isoleucyl-Thiazolidid (1a), einem reversiblen DP IV-Inhibitor in 20 %-igem Serum bei pH 7.6 und 30 °C die komplette Unterdrückung der Enzym-katalysierten Hydrolyse beider Peptid-hormone innerhalb von 24 Stunden (1b und 1c, jeweils obere Spektren. Synthetisches GIP₁₋₄₂ (5 μM) und synthetisches GLP-1₇₋₃₆ (15 μM) wurden mit humanem Serum (20 %) in 0.1 mM TRICINE Puffer bei pH 7.6 und 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Proben der Inkubationsansätze (für GIP₁₋₄₂ 2.5 pmol und im Falle von GLP-1₇₋₃₆ 7.5 pmol) wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden mit 2',6'-Dihydroxyacetophenon als Matrix co-kristallisiert und mittels MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert. Die Spektren (Abb. 1) stellen Akkumulationen von 250 einzelnen Laserschüssen pro Probe dar.

- (1b) Die Signale im Bereich von m/z 4980.1 ± 5.3 entsprechen GIP₁₋₄₂ (M 4975.6) und m/z 4745.2 ±5.5 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GIP₃₋₄₂ (M 4740.4).
 - (1c) Die Signale m/z 3325.0 ± 1.2 entsprechen GLP-1_{7.36} (M 3297.7) und m/z 3116.7 ± 1.3 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GLP-1_{9.36} (M 3089.6).

In den Versuchsansätzen ohne Inhibitor wurden die Incretine in dieser Zeit fast vollständig abgebaut (Abb. 1b und 1c, jeweils untere Spektren).

Beispiel 2: Inhibierung des Abbaus von GLP-17-36 durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid in vivo.

Verfolgt man den Metabolismus der nativen Incretine (hier GLP-1₇₋₃₆) im Serum der Ratte in Abhängigkeit in Gegenwart des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid (i.v. Injektion einer 1.5 μM Inhibitorlösung in 0.9 %-iger Kochsalzlösung) gegenüber einer Kontrolle, so ist bei einer Konzentration des Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid von ca. 0.1 mg/kg Laborratte bei den Inhibitor-behandelten Versuchstieren (n = 5) im Verlaufe des Versuchszeitraums kein Abbau des insulino-tropen Peptidhormons GLP-1₇₋₃₆ zu beobachten (Abb. 2).

Zur Detektion der Metaboliten in Anwesenheit und Abwesenheit des DP IV-Inhibitors (20 Minuten nach vorheriger i.v.-Inhibitor- bzw. Kochsalzgabe) erhielten die Versuchs- und Kontrolltiere i.v. 50 - 100 pM ¹²⁵I-GLP-1₇₋₃₆ (spezifische Aktivität ca. 1 μMCi/pM). Blutproben wurden nach 2 - 5 min entnommen und das Plasma mittels 20 % Acetonitril extrahiert. Nachfolgend wurde der Peptidextrakt mittels RP-HPLC separiert und die Radioaktivität der Fraktionen an einem γ-Counter analysiert. Die gefundene Aktivität ist in cpm (counts per minute relativ zum Maximum angegeben).

Beispiel 3: Modulation der Insulinwirkung und Senkung des Blutglukosespiegels nach i.v.

Applikation des DP IV-Inhibitors Isoleuzyl-Thiazolidid in vivo.

20

25

5

An der durch intraduodenale (*i.d.*) Injektion Glukose-stimulierten Ratte, kann durch *i.v.* Gabe verschiedener DP IV-Effektoren, z. B. von 0.1 mg Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte eine auf die Inhibitorwirkung zurückgehende, zeitlich verzögert einsetzende Senkung des Glukosespiegels beobachtet werden. Dieser Effekt ist dosisabhängig und nach Absetzen der Infusion von 0.05 mg/min des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte reversibel. Die *i.v.* Applikation der gleichen Glukosemenge von Inhibitor-behandelten und Kontroll-Tieren zeigt im Gegensatz zur den *i.d.* Glukose-stimulierten Versuchstieren keine vergleichbare Wirkung. Abbildung 3 verdeutlicht diese Zusammenhänge an den Inhibitor-abhängigen Veränderungen der Plasmaparameter: A - DP IV-Aktivität, B - Plasma-Insulinspiegel, C - Blutglukosespiegel.

10

15

Die Versuchstiere (n = 5, männliche Wistar-Ratten, 200-225 g) erhielten als Initialdosis 1.5 µM Isoleucyl-Thiazolidid in 0.9 %-iger Kochsalzlösung (▲) oder gleiche Volumina 0.9%-ige Kochsalzlösung ohne Inhibitor (■) (Kontrollgruppe n = 5). Die Versuchsgruppe erhielt weiterhin eine Infusion des Inhibitors von 0.75 µM/min über 30 min Versuchszeit (*). Der Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitraum eine Inhibitor-freie 0.9%-ige Kochsalzlösung infundiert. Zum Zeitpunkt t=0 erhielten die Tiere i.d. eine Glukosedosis von 1g/kg 40%-

iger Dextroselösung (w/v).

Allen Versuchstieren wurden Blutproben in zehn Minutenabständen entnommen.

Glukose Messungen erfolgten am Vollblut (Lifescan One Touch II analyzer) während die DP IV-Aktivität und die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt wurden.

Der hier angewandte Insulintest ist empfindlich zwischen 10 und 160 mU/ml [PEDERSON, R.A., BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B. & BROWN, J.C. Reg. Peptides. 3, 53-63 (1982)]. Die DP IV-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes. Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

10

Patentansprüche

- Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus.
- 2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischer Azidosen und Diabetes mellitus dient.
- 3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.
- 4. Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

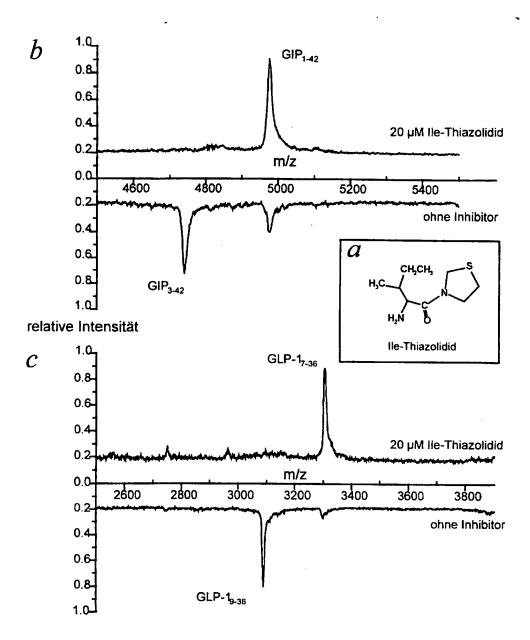


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GlP₁₋₄₂ (b) und GLP-₇₋₃₆ und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

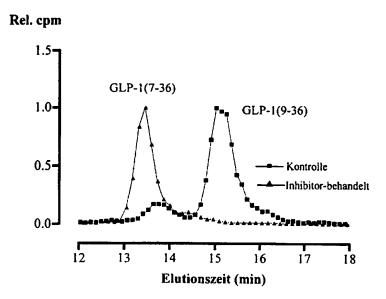
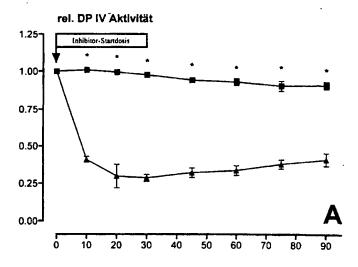
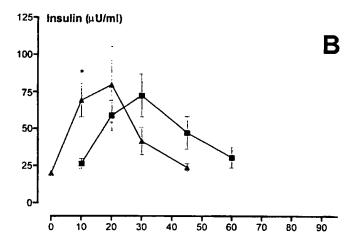


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.





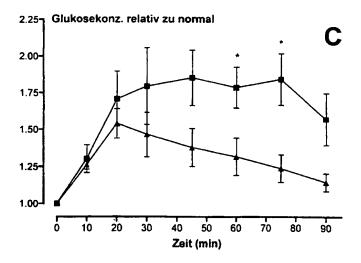


Abb. 3: Einfluß des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der i.d.-Glukose-stimulierten Ratte.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/DE 97/00820

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/425		
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	o International Patent Classification (IPC) or to both national class SEARCHED	fication and IPC	
	ocumentation searched (classification system followed by classification)	tion symbols)	
IPC 6	A61K		
Documentat	tion searched other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in the fields s	earched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data ba	se and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the r	relevant passages	Relevant to claim No.
A	HU. DEMUTH: "Recent development inhibiting cysteine and serine poly. ENZYME INHIB., vol. 3, no. 4, 1990, pages 249-278, XP002041620 cited in the application		
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucage peptide 1 in vitro and in vivo be dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, vol. 136, no. 8, 1995, pages 3585-3597, XP002041621	on-like	
		-/	
X Furt	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
'A' docum consid 'E' earlier filing 'L' docum which citatio	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another n or other special reason (as specified) the properties of the proper	"T" later document published after the into or priority date and not in conflict wicked to understand the principle or the invention of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or ments, such combination being obvious	th the application but heory underlying the claimed invention: be considered to current is taken alone claimed invention ventive step when the one other such docu-
	ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	in the art. "&" document member of the same patent	
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international se	arch report
2	4 September 1997	13.10.97	
Name and r	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Authorized officer	
1	Far (+31.70) 340.3016	Klaver, T	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/DE 97/00820

		PCT/DE 97/00820			
Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Classics of decument, with industrion where appropriate, of the relevant passages Classics of decument, with industrion where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.					
ategory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referent to Claim No.			
4	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21 November 1991 see abstract				
1	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24 August 1995				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/DE 97/00820

Information on patent family members		bers	PCT/DE	97/00820
Patent document cited in search report	Publication date	Patent fam member(s	ily)	Publication date
WO 9522326 A	24-08-95	JP 72285 AU 6812 AU 17181 EP 07544	95 A	29-08-95 21-08-97 04-09-95 22-01-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. .ales Aktenzerchen
PCT/DE 97/00820

A. KLAS	SIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES A61K31/425		
Nach der I	Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen k	Classifikation und der IPK	
	ERCHIERTE GEBIETE		
Recherchie IPK 6	erter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssym A61K	bole)	
Recherchie	erte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s	soweit diese unter die recherchierten Gebiet	e fallen
Während d	der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank ()	Name der Datenbank und evil. verwendete	Suchbegriffe)
C. ALS W	VESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	T	be der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HU. DEMUTH: "Recent development inhibiting cysteine and serine produced of the produced of t		
Α	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucage peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, Bd. 136, Nr. 8, 1995, Seiten 3585-3597, XP002041621	on-like	
		-/	
	citere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu mehrnen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröf aber "E" ältere: Anm "L' Veröf schei andei soll o ausge "O" Veröf eine "P" Veröf dem	re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist s Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen neldedatum veröffentlicht worden ist ffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritättanspruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genamnten Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genamnten Veröffentlichungsdatum einer feltigt die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eführt) ffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht ffentlichung, die vor dem internationalen Armeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach den oder dem Prionitätsdaum veröffentlich Anmeidung nicht kollidiert, sondern n Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theone angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bede kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bede kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betr "Y" Veröffentlichung von besonderer Bede kann nicht als auf erfinderischer Tätig werden, wenn die Veröffentlichung m Veröffentlichungen dieser Kategone ir diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselbe Absendedatum des internationalen Re	nt worden ist und mit der ur zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden utung; die beanspruchte Erfindung ichtung nicht als neu oder auf ichtet werden utung; die beanspruchte Erfindung keit berühend betrachtet t einer oder mehreren anderen i Verbindung gebracht wird und naheliegend ist en Patentfamilie ist
	24. September 1997	1 3. 10. 97	
Name und	Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Klaver, T	-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	37700020		
C.(Fortsetzu Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kom	menden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
A	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE), 21.November 1991 siehe Zusammenfassung			
A	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24.August 1995 			
	·			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten nales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentiamilie genoren			PCT/DE 97/00820	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) de Patentfamilie	r	Datum der Veröffentlichung
WO 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 AU 681251 AU 1718195 EP 0754454	. B . A	29-08-95 21-08-97 04-09-95 22-01-97
				•

BERICHTIGTE **FASSUNG***

WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/40832

A61K 31/425

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

6. November 1997 (06.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/00820

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. April 1997 (24.04.97)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,

FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 16 486.9

25. April 1996 (25.04.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG

E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). ROSCHE, Fred [DE/DE]; Benndorfer Strasse 18a, D-06184 Dieskau (DE). SCHMIDT, Jörn [DE/DE]; Eichendorffstrasse 2, D-06114 Halle (DE). PAULY, Robert, P. [CA/CA]; 2631 Fairview Crescent, Vancouver, British Columbia V6T 2B8 (CA). MCINTOSH, Christopher, H., S. [CA/CA]; 605-2233 Allison Road, Vancouver, British Columbia V6T 1T7 (CA). PEDERSON, Ray, A. [CA/CA]; 3876 West 23rd Avenue, Vancouver, British Columbia V6S 1K9 (CA).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

eintreffen.

(54) Title: USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV EFFECTORS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV EFFEKTOREN ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSESP-TEGELS IN SÄUGERN

(57) Abstract

The invention relates to the use of a method in which by reducing in the blood of a mammal by administration of effectors the enzyme activity of dipeptidyl peptidase (DP IV) or enzyme activity similar to DP IV, the endogenous (or additionally exogenously administered) insulinotropic peptide gastric inhibitory polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) and glucagon-like peptide amide-1 7-36 (GLP-17-36) (or similarly GLP-17-37 or analogues thereof) are decomposed in a causal sequence to a reduced extent by DP IV enzymes or those similar to DP IV. Consequently, the fall in the concentration of said peptide hormones or the analogues thereof is reduced or retarded. The increased stability, achieved by the action of DP IV effectors, of the incretine or the analogues thereof which are available endogenously and consequently provided in increased numbers for insulinotropic stimulation of the incretine receptors of the Langerhans cells in the pancreas, changes the power of endogenous insulin thereby stimulating the metabolism of carbohydrates in the treated organism. The blood sugar level therefore drops below the glucose concentration, characteristic of hyperglycaemia, in the serum of the treated organism. Metabolic anomalies such as glucosuria, hyperlipidemia, possible serious metabolic acidosis, diabetes mellitus, which result from higher concentrations of glucose in the blood over a longer period of time, are prevented or alleviated. The method according to the invention is a novel way of lowering high blood glucose concentrations. It is simple, commercially applicable and suitable for use in human medicine for treating, in particular diseases caused by above-average blood glucose levels.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP1-42) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-17-36) (o.a. GLP-17-37 oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	Si	Stowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadachikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	H.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	••	Amerika
CF.	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		7311104044
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		